中華農業研究(J. Agric. Res. China) 52:258~267 (2003)

台灣原生杜鵑屬(*Rhododendron* spp.)種原遺傳歧異性之分析 [1]

范明仁 [2,4]　王昭月 [2]　羅舜芳 [2]　曾彥學 [3]

摘　要

范明仁、王昭月、羅舜芳、曾彥學。2003。台灣原生杜鵑屬種原之遺傳歧異度分析。中華農業研究 52:258-267。

本研究共選取台灣原生杜鵑屬(*Rhododendron* spp.)11 個種，含不同來源地共 23 個樣品。利用 RAPD(random amplified polymorphic DNA)分析方法，旨在藉以評估 11 個種間之遺傳距離，經由 60 個 引子中篩選七個具多型性且再現性良好之 6 個引子，計獲得 18 個多型性 DNA 片段，可作爲金毛杜鵑(*R. oldhami*)、馬銀花(*R. ovatum*)、紅毛杜鵑(*R. rubropilosum*)、南湖杜鵑(*R. hyperthrum*)、西施花(*R. ellipticum*)、南澳杜鵑(*R. breviperulatum*)以及守城滿山紅(*R. mariesii*)等七個"種"鑑別之專屬標誌條帶。而綜合 6 個引子之 RAPD 分析產物，經 UPGMA 集群分析之樹狀圖可分成 4 個亞集群，結果大致與第二版台灣植物誌採用之杜鵑屬分類接近，其中來自不同地區的金毛杜鵑(6 個樣品)，明顯有同"種"聚集一起之趨勢，其遺傳距離最相近。綜合而言，RAPD 分析應可作爲台灣原生杜鵑遺傳距離分析的有效方法之一。

關鍵詞：杜鵑、逢機增殖多型性 DNA、集群分析、遺傳歧異度。

前　言

自 1993 年全球"生物多樣性公約協議本文(Agreed Text of Convention on Biological Diversity)"生效後，世界各國開始意識到生物多樣性對演化及生態環境平衡的重要性(金 1999)，並且意識到生物資源將爲各國 21 世紀之重要資源。遺傳多樣性(genetic diversity)係代表遺傳資源的豐富與否，爲作物育種之原動力，且與種原利用效益息息相關。研究遺傳歧異最有效的方法是利用分子層次來探討，即以基因來闡明生物遺傳基質之變化。一般由植株形態之不同，並無法達到完全區分品種的目的，且往往要種植至成株始可進行性狀之判別。自 1990 年 Williams 等人及 1991 年 Welsh 等人提出操作簡單且於幼苗初期即可進行篩選工作的 RAPD 技術以來，利用 RAPD 標誌在植物基因上之研究報導就陸續刊出，

1. 行政院農業委員會農業試驗所研究報告第 2168 號。接受日期：92 年 8 月 28 日。
2. 本所所作物種原組研究員兼組長、助理研究員及計畫助理。臺灣省　臺中縣　霧峰鄉。
3. 行政院農業委員會特有生物研究保育中心植物組副研究員。臺灣省　南投縣　集集鎮。
4. 通訊作者，電子郵件：mifan@wufeng.tari.gov.tw；傳真機：(04)23331705。

包括有：特定基因之分析(Delourme *et al.*1994)、營養繁殖體基因特性與變異之分析(Brown *et al.* 1993；Isabel *et al.*1993)、種間基因分析與鑑定(Parani *et al.* 1997；Swoboda & Bhalla 1997；Wilkie *et al.* 1993)、栽培品種鑑定與分類(Tivang *et al.* 1996；Yang & Quiros 1993；Yu & Nyuyen 1994)、作物親緣關係之研究(范等 1999b ; Millan *et al.* 1996)。其後並陸續有水稻(Oard & Dronavalli 1992 ; Xiao *et al.* 1996)、小麥(Asakura *et al.* 1997)、油菜(Delourme *et al.* 1994；Mikkelsen *et al.* 1996)、馬鈴薯(Blok *et al.* 1997；Demeke *et al.* 1996)、咖啡(Orozco-Castillo *et al.* 1994)、木瓜(Stiles *et al.* 1993)、番椒(王等 1995，1996，1997)等多數作物的種原鑑別或基因分析研究報告提出。

全世界的杜鵑花大約有九百種左右，隸屬於杜鵑科(Ericaceae)杜鵑花屬(*Rhododendron*)，主要分布於北半球熱帶、亞熱帶至高山寒帶地區，其中地生型杜鵑以中國大陸雲貴高原一帶為主要的分布中心，沿喜馬拉雅山脈的尼泊爾、錫金、不丹、西藏、緬甸等地向外擴展逐漸演變成今日的分布。另一群著生型杜鵑則是以東印度群島，即印尼、馬來西亞、新幾內亞及附近島嶼為主要分布中心，再向外擴展。亞洲大約八百五十幾種，中國就有五百多種；北美洲有二十四種；歐洲有九種；澳洲僅產一種；而非洲及南美洲則無杜鵑花。臺灣正位於東亞地生型杜鵑與著生型杜鵑分布的交匯地區，加上島內氣候變化萬千，高山群峰層疊，地形極為複雜，故衍生許多野生杜鵑。

杜鵑用途可作為盆栽、庭園美化、抽取香精、柴薪及藥用等(呂等 1989；馬等 1989)，由於其栽培不易，分佈又具有地域性，加上原生育地受到人為破壞或消失，因而有部分品種已瀕臨絕種，如烏來杜鵑目前在野外已無任何原生之植株(林等 1993)。本省原生杜鵑若依其型態特徵進行"種"之分類時，容易由於棲息地之氣候影響外觀之判斷，且杜鵑本身種內表現性狀變化頗大，加上人工育種選拔甚久，造成基因之流失以及遺傳之同質性，亦使基因庫內之遺傳多樣性變小。因此，擬由分子層次探討台灣原生杜鵑種原之生物歧異度，種間分子標誌與其表現形態、地域分佈之關係，期盼能藉此達到提昇種原蒐集及保存之效率，並可為研究人員對台灣原生杜鵑種原之復育與繁殖時之參考依據。然而國內外學者對杜鵑"種"間鑑別或分子標誌之研究並不多，國內學者曾利用同功異構酵素進行原生杜鵑遺傳變異之分析；如 1989 年馬溯軒等人發現爬地杜鵑(唐杜鵑：*R. simsii*)及大屯杜鵑(唐杜鵑：*R. simsii*)之脂化酵素(esterase)可其為遺傳指標(馬等 1989)；而 1991 年林素夷之研究顯示葉部脂化酵素及根部過氧化酵素(peroxidase)亦可為種間鑑別之證明(林等 1991)；1993 年林明勇等之研究提出脂化酵素及麩胺酸草醯酸轉氨酵素(Glutamate oxaloacetate transaminase, GOT)可用以瞭解烏來杜鵑(*R. kanehirai*)不同來源地區的基因差異(林等 1993)；綜合上述顯示，利用同功異構酵素可做為評估杜鵑族群內或族群間遺傳變異之生化指標；但目前可供評估之同功異構酵素標誌仍然太少且費時，故期能由 RAPD 分析技術，就 DNA 層次所獲得之分子標誌資料來建立對杜鵑屬(*Rhododendron* spp.)之不同來源地方種原之歧異度或種原間親緣遠近之探討。近代學者(Iqbal *et al.* 1995；Levi *et al.* 1993)曾針對國外之杜鵑部份品種及其雜交種，利用 RAPD 分子標誌的方法進行其遺傳親緣關係之評估，其樹狀分析結果可顯示雜交種與其親本之血緣關係；因此本試驗乃採用 RAPD 分子標誌的方法來鑑別杜鵑種原之遺傳親緣關係。

材料與方法

供試杜鵑品種

由林業試驗所福山分所、特有生物保育中心、桃園地區及陽明山國家公園等地採集台灣原生杜鵑十一個種 23 個樣品(表 1)，包括烏來杜鵑(*R. kanehirai*；特有種)、西施花(*R. ellipticum*；廣泛種)、台灣杜鵑(*R. formosanum*；特有種)、大屯杜鵑(*R. simsii*；廣泛種-唐杜鵑)、爬地杜鵑(*R. simsii*；廣泛種-唐杜鵑)、南澳杜鵑(*R. breviperulatum*；特有種-埔里杜鵑)、唐杜鵑(*R. simsii*；廣泛種)、金毛杜鵑(*R. oldhamii*；特有種)、南湖杜鵑(*R. hyperythrum*；特有種)、細葉杜鵑(*R. noriakianum*；特有種)、馬銀花(*R. ovatum*；廣泛種)、紅毛杜鵑(*R. rubropilosum*；特有種)、守城滿山紅(*R. mariesii*)及滿山紅(*R. mariesii*)等，取嫩葉並進行 genomic DNA 之萃取。

DNA 萃取

DNA 之萃取方法主要參考 Rogers 所提之方法，每一品種各取 5~10 個單株之嫩葉 1 公克以液態氮磨碎，放入 1.5 ml 已滅菌的小離心管，加入 500 μl 的 DNA 萃取緩衝液(2% CTAB；100 mM Tris-HCl，pH 8.0; 20 mM EDTA；1.4 mM NaCl; 1%(v/v) β-mercaptoethenol；1% polivinyl polypyrrolidone(PVP)，於 60℃水浴 30 分鐘，輕輕混勻後加入 500 μl chloroform/ isoamyl alcohol (24：1 ,v/v)再輕輕混勻。以 20℃，16,000g 離心 10 分鐘(SIGMA 2K15，rotor 12145)。取上清液加入 300 μl 之冰冷 isopropanol 以沉澱 DNA。再於 4℃，16,000g 離心 10 分鐘。沉澱之 DNA，再加入 1 ml 的 washing buffer (76% ethanol (v/v);10 mM ammonium acetate) 輕輕混勻後，於 4℃下以 16,000g 離心 10 分鐘。留取 DNA 沉澱物乾燥後溶於 50 μl 的無菌水再加入 RNase (10 μg/ml)在 37℃下反應 30 分鐘。將 DNA 溶液，稀釋並測定 OD_{260} nm 之讀值，及計算 DNA 濃度(Rogers & Bendich 1994)。

聚合酵素連鎖反應 (Polymerase Chain Reaction，PCR) 與電泳

利用 10 個核甘酸序列的隨意引子 60 條(Operom random primer kit OPE、OPQ 及 OPR；20 個/組)，進行 primer 篩選之聚合酵素連鎖反應。PCR 反應液及反應溫度條件參考 Oard 所提，反應總體積為 25 μl，內含 1 U Taq polymerase (Promega)、1×PCR buffer(50 mM KCl；10 mM Tris-HCl，pH 9.0；0.1% Triton 100)、2.5mM $MgCl_2$、200 μM dNTP、0.2 μM primer 及 25 ng template DNA。聚合酵素連鎖反應儀器為 Perkin Elmer Cetus Thermal Cycler 9600，反應溫度設定如下：1 次(cycle)：94℃，3 分鐘→40℃，1

表 1. 供試杜鵑之樣品代號、學名、中名、採集地、花色、花朵數及生長海拔

Table 1. The sample number, scientific name, chinese name, sampling area, flower color and flowers of *Rhododendron* spp

Sample no.	Scientific name	Chinese name	Sampling area	Floral color	Flowers
1	*R. simsii*	唐杜鵑(大屯杜鵑)	Yag-Ming Shan National Park	Red	1-3
2	*R. formosanum*	台灣杜鵑	Fu-Shan Research Station, (TFRI)	White	7-10
3	*R. ellipticum*	西施花	Yag-Ming Shan National Park	Pink	2-4
4	*R. ellipticum*	西施花	Fu-Shan Research Station, (TFRI)	Pink	2-4
5	*R. simsii*	唐杜鵑(爬地杜鵑)	Taoyuan local farmer	Red	1-3
6	*R. simsii*	唐杜鵑(爬地杜鵑)	Yag-Ming Shan National Park	Red	1-3
7	*R. oldhami*	金毛杜鵑	Yag-Ming Shan National Park	Red	1-4
8	*R. oldhami*	金毛杜鵑	Taiwan Endemic Species Research	Red	1-4
9	*R. oldhami*	金毛杜鵑	Fu-Shan Research Station, (TFRI)	Red	1-4
10	*R. oldhami*	金毛杜鵑	Taoyuan local farmer #1	Red	1-4
11	*R. oldhami*	金毛杜鵑	Taoyuan local farmer #2	Red	1-4
12	*R. oldhami*	金毛杜鵑	Taoyuan local farmer #3	Red	1-4
13	*R. rubropilosum*	紅毛杜鵑	Fu-Shan Research Station, (TFRI)	Pink	1-4
14	*R. hyperthrum*	南湖杜鵑	YagMing Shan National Park	White	4-8
15	*R. simsii*	唐杜鵑	Fu-Shan Research Station, (TFRI)	Red	2-6
16	*R. breviperulatum*	南澳杜鵑	Fu-Shan Research Station, (TFRI)	Pink	2-4
17	*R. kanehirai*	烏來杜鵑	Taoyuan local farmer	Pink	2-4
18	*R. kanehirai*	烏來杜鵑	Taiwan Endemic species research Institute (ESRI)	Pink	2-4
19	*R. kanehirai*	烏來杜鵑	Fu-Shan Research Station, (TFRI)	Pink	2-4
20	*R. ovatum*	馬銀花	Fu-Shan Research Station, (TFRI)	Pink	1
21	*R.noriakianum noriakianum*	細葉杜鵑	Fu-Shan Research Station, (TFRI)	Red	2-4
22	*R. mariesii*	守城滿山紅	YagMing Shan National Park	White	2
23	*R. sp.*	滿山紅	Fu-Shan Research Station, (TFRI)	Pink	1-3

分鐘→72℃，1 分鐘；44 次(cycles)：94℃，1 分鐘→40℃，1 分鐘→72℃，2 分鐘 30 秒。反應完成時自動保存在 4℃。經聚合酵素連鎖反應而增殖之 DNA，以 2%的 agarose 在 TAE buffer (40 mM Tris acetate，pH 8.0；1mM EDTA)中進行 DNA 電泳(Oard & Dronalli 1992)。並以 Boeheringer Mannheim 公司之 DNA molecular weight marker XVI (250 bp ladder)做爲分子量標誌，電泳槽係採用 Cosmo 生產 Mupid-2，結束後以 ethidium bromide 染色，以 UV 光檢視 agarose 膠體上 DNA 多型性片段，並照相及貯存影像於 IS 2000 Digital Imaging System (Alpha Innotech Corporation)進行分析。

資料分析

將 IS 2000 Digital Imaging System 所存電泳結果之 TIF 檔案，利用 Applied Meths BVBA 公司所出之 GelCompar™ 軟體，進行 DNA 條帶之判讀，再將其轉換成 0 / 1 型態之資料，利用 SAS 統計分析軟體中 Jaccard's coefficient analysis 爲基礎之 UPGMA (Unweighted Pair-Grouping Mean Arithmetical)集群分析，估算品系間遺傳歧異度。判讀台灣原生杜鵑屬內"種"間及"種"內之遺傳距離及其遺傳歧異度，比較以型態爲基礎之台灣原生杜鵑屬內"種"之分類，並以分子生物多型性之結果，期能協助解決"種"分類上之問題與種原保存及育種之參考，並進一步與引進種杜鵑之 RAPD 圖譜相互比對其親緣關係，以了解地理分佈與遺傳歧異性之關係。

結　果

RAPD 分析與台灣原生杜鵑遺傳歧異性之探討

本試驗以 60 條逢機引子(Operon kit: OPE、OPQ 及 OPR)應用 RAPD 方法進行部分樣品篩選，有 25 條引子具"種"間多型性，占全部引子數之 41.7%，顯示其種間之多型性極高。以此 25 條引子進一步篩選全部樣品後，選取其中 7 個具多型性，且再現性良好之引子（OPE3、OPE7 及 OPE15、OPE19、OPE20、OPR3、OPR16），共可得到 175 個 RAPD 片段，其中 168 片段具多型性，其分子量大小介於 235～3,256 bp 之間，平均每個引子反應可產生 25 個 RAPD 片段（表 2）。

台灣原生杜鵑屬之種間 RAPD 標誌條帶

自多型性引子之 RAPD 片段，篩選其可供 "種"鑑定之特定標誌片段，可獲得 18 個特定 DNA 片段（表 2、表 3）。據此，供試的十一個 "種"中除唐杜鵑(爬地杜鵑、大屯杜鵑)、烏來杜鵑及細葉杜鵑外，其餘八個"種"均可獲得鑑別用之專屬標誌條帶，其中馬銀花"種"的專屬標誌片段爲最多，共有 OPE3-296 bp、OPE7-296 bp 、OPE19-2,316 bp 、OPE19-1,272 bp、 OPE20-416bp 等五個片段；另 OPE3-323 bp、OPE7-323 bp 及 OPE19-401 bp 則爲紅毛杜鵑之"種"之專屬標誌片段；而 OPE19-640 bp、

表 2. 台灣原生杜鵑 RAPD 分析中具多型性之引子及其多型性特性

Table 2. The characteristics and sequence of those primers have polymorphism in RAPD studies in *Rhododendron* native in Taiwan

Primer	Sequences	Product sizes (bp)	No. of fragments	Polymorphic fragments	Specific fragments for Identification
OPE3	5'-CCAGATGCAC-3'	2,407-287	23	23	3
OPE7	5'-AGATGCAGCC-3'	2,257-419	23	23	2
OPE15	5'-ACGCACAACC-3'	3,256-313	27	27	1
OPE19	5'-ACGGCGTATG-3'	2,723-257	28	21	5
OPE20	5'-AACGGTGACC-3'	2,330-261	26	25	4
OPR3	5'-ACACAGAGGG-3'	1,713-235	22	22	2
OPR16	5'-CTCTGCGCGT-3'	3,133-270	26	26	1
Total			**175**	**167**	**18**

OPE20-1,530 bp 及 OPR3-945 bp 則爲南湖杜鵑之鑑別標誌片段；西施花“種”的標誌片段分別爲 OPE15-3,256 bp 以及 OPE19-308 bp；守城滿山紅“種”之鑑別標誌片段，則爲 OPR3-753 bp 及 OPR16-460 bp 兩個片段可用以鑑別。其餘金毛杜鵑有一個“種”之專屬標誌片段 OPE3-697 bp；台灣杜鵑有一個“種”之專屬標誌片段 OPE20-263 bp；南澳杜鵑亦有一個“種”之專屬標誌片段 OPE20-1,941 bp（表 3）。

RAPD 集群分析之結果

將7個多型性引子經RAPD(部份電泳結果如圖1)分析所產生之175 個DNA片段，合併進行Jaccard correlation 相似性係數爲基礎之 UPGMA (Unweighted Pair-Grouping Mean Arithmetical) 集群分析。由樹狀群集分析圖(hierarchical clustering)顯示，遺傳距離介於 0~1.25 之間(圖 2)，並可分爲四個主要之亞集群，其中第一大群包含有 10 個樣品，分別爲烏來杜鵑 3 個樣品、唐杜鵑 3 個樣品、南澳杜鵑 1 個樣品、細葉杜鵑 1 個樣品以及滿山紅 1 個樣品；第二群爲遺傳距離最相近之金毛杜鵑，其樣品間遺傳距離均小於 0.75，且來自不同地區的 6 個樣品，明顯具有同"種"聚集一起之表現；第三群包含的 4 個樣品，分別爲遺傳距離很相近(0.75)的西施花 2 個、遺傳距離較大的馬銀花以及由地區性農戶自行繁殖的唐杜鵑 1 個；第四群則爲遺傳距離最大的 3 個樣品，分別爲南湖杜鵑、台灣杜鵑以及具落葉習性與花葉混生的守城滿山紅(圖 2)。

討　論

杜鵑花屬是顯花植物中種類繁多的一屬，其生長環境從高山草原到熱帶雨林，生長海拔從海平面到 18,000 英呎以上(呂 1989；馬 1989)，因此，杜鵑對生長環境之適應能力極大，推測其種原之多樣性及歧異度應屬較高。本試驗應用 RAPD 方法，自 60 條逢機引子(Operon kit: OPE、OPQ 及 OPR)篩選出多型性與再現性穩定 7 條引子，共可得到 175 個 RAPD 片段，其中 167 片段具多型性，其分子量大小介於 235~3,256 bp 之間(表 2)，平均每個引子反應可產生 25 個 RAPD 片段；此與國外 RAPD 用於種原分析，其多型性產物片段爲 11~20 個之結果略高(Millan *et al.* 1996)。而本試驗所獲得 18 個可供作爲輔助“種”鑑定之 RAPD 標誌片段中，馬銀花具有最多的標誌片段 5 個；其次是紅毛杜鵑、南湖杜鵑、西施花、守城滿山紅也分別有兩個以上的標誌片段；而金毛杜鵑則是 6 個樣品均驗證同一專屬之標誌片段；以上 15 個片段可提供作爲“種”間多重確認之利用，故對於其相對應之“種”的鑑別上應較具有客觀判斷之效。唯唐杜鵑及烏來杜鵑的不同地區之樣品間，存在差異的 RAPD 片段，則無法有“種”內專屬的標誌片段。

表 3. 原生杜鵑種間之專屬標誌 RAPD 片段

Table 3. Specific RAPD markers for species identification of *Rhododendron* native in Taiwan

Scientific name	Chinese name	Specific RAPD markers
R. ovatum	馬銀花	OPE3-296 bp; OPE7-296 bp; OPE19-2,316 bp; OPE19-1,272 bp; OPE20-416 bp
R. oldhami	金毛杜鵑	OPE3-697 bp
R. rubropilosum	紅毛杜鵑	OPE3-323 bp ；OPE7-323 bp；OPE19-401 bp
R. ellipticum	西施花	OPE15-3,256 bp；OPE19-308 bp
R. formosanum	台灣杜鵑	OPE20-263 bp
R. hyperthrum	南湖杜鵑	OPE19-640 bp ；OPE20-1,530 bp ；OPR3-945bp
R. mariesii	守城滿山紅	OPR3-753bp；OPR16-460bp
R. breviperulatum	南澳杜鵑	OPE20-1,941 bp

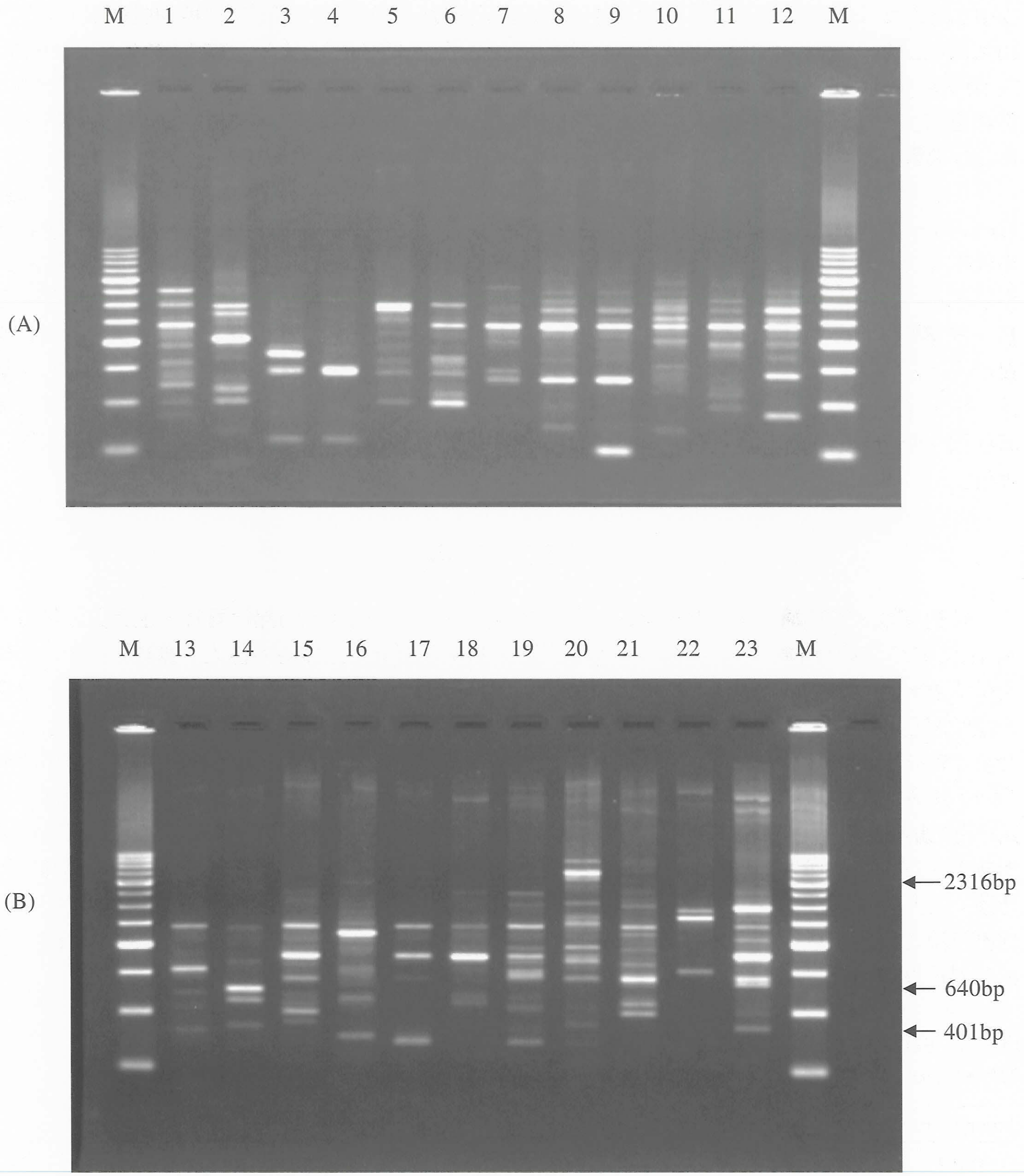

圖 1. 杜鵑 23 品系(品系代碼詳見表 1)，以 OPE19 爲引子之 RAPD 圖譜(A,B)。

Fig.1. RAPD profiles (A,B) generated by primer OPE19 and resolved by 2.0% agarose gel. Numbers on top refer to the accessions same as listed in Table 1． M: molecular marker (BM# 1855638). Sample no. 1,5,6,15: *R. simsii;* 2: *R. formosanum;* 3: *R. ellipticum*；7,8,9,10,11, 12: *R. oldhami*;13: *R. rubropilosum;* 14: *R. hyperthrum*；16: *R. breviperulatum*；17,18,19: *R. kanehirai;* 20: *R. ovatum;* 21: *R. noriakianum;* 22: *R. mariesii;* 23:R. sp.

RAPD 產物經由群集分析樹狀圖顯示，分成的四亞集群，其中來自不同地區的 6 個樣品之金毛杜鵑，遺傳距離最相近，且明顯具有同"種"聚集一起之遺傳表現；烏來杜鵑、唐杜鵑、南澳杜鵑、細葉杜鵑等小葉型杜鵑樣品只呈現零星群集現象；而遺傳距離較大的第三 、四群主要包含大葉型粉白色花的南湖杜鵑、台灣杜鵑、西施花；而 “馬銀花” 與地區性農戶自行繁殖的 “唐杜鵑” ，以及落葉性以及花葉混生的 “守城滿山紅” ，此三者則表現較大的遺傳差異性，值得進一步探討。另試驗材料中，自福山植物園採集之滿山紅杜鵑，依中文名原推測爲(*R. mariesii*)，按植物分類應與陽明山的守城滿山紅(*R. mariesii*)，爲同 “種” (馬 1989)，但就本試驗觀察結果，其葉型類似細葉杜鵑，且二者在 RAPD 之樹狀圖分屬第一及第四群集，亦值得進一步探討是否爲採樣時誤取樣品之差誤。但整體而言，RAPD 分析結果還是可將花序不同、或葉型大小不同之杜鵑 “種”間予以分群，且大致與第二版台灣植物誌採用之花序及葉型的杜鵑屬分類接近，故應可提供作爲一分子層次之參考資料。此外，由 RAPD 分析中，所獲得之種間專屬標誌條帶，亦可做爲台灣原生杜鵑種別鑑定之參考。

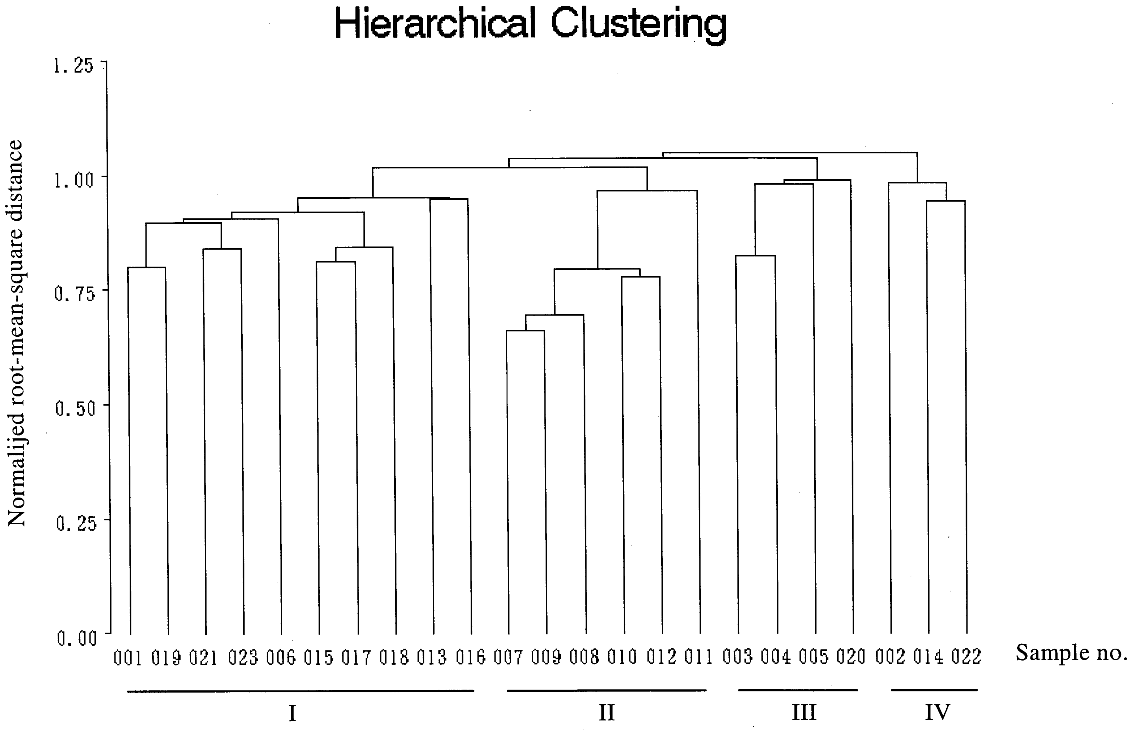

圖 2. 台灣原生杜鵑 23 個樣品綜合七個引子(OPE3, OPE7, OPE15, OPE19, OPE20, OPR3, and OPR16)之 RAPD 圖譜，經以 Jaccard's 相關係數爲基礎之 UPGMA 集群分析樹狀圖。

Fig.2. RAPD dendrogram of 23 accessions of *Rhododendron* native in Taiwan generated by 7 primers (OPE3, OPE7, OPE15, OPE19, OPE20, OPR3, and OPR16), and constructed by UPGMA cluster analysis which based on the Jaccard's correlation matrix. Sample no. 1,5,6,15: *R. simsii;* 2: *R. formosanum;* 3: *R. ellipticum*；7,8,9,10,11, 12: *R. oldhami*;13: *R. rubropilosum;* 14: *R. hyperthrum* ； 16: *R. breviperulatum* ； 17,18,19: *R. kanehirai;* 20: *R. ovatum;* 21: *R. noriakianum;* 22: *R. mariesii;* 23:R. sp.

誌　謝

本計畫承蒙農委會經費補助（89 生技-2.1-糧-01 (11)）特此致謝。另本試驗承蒙陽明山國家公園、林試所福山分所、特有生物保育中心及北部農民提供台灣原生杜鵑種原試驗材料，使得本試驗得以順利進行，特此僅致誠摯的謝意。

引用文獻

王昭月。1995。同功異構酵素與逢機增殖多型性 DNA 標誌在番椒品種鑑別之研究。國立中興大學碩士論文。152 pp。

王昭月、范明仁、羅舜芳。1997。利用 RAPD 分子標誌估測番椒屬種原歧異性之研究。中華農業研究 46(4):314-323。

王昭月、范明仁、羅舜芳、劉新裕。1996。以逢機增殖多型性 DNA 分子標誌鑑別番椒屬野生馴化種原。中華農業研究 45(4):370-381。

呂勝由、楊遠波。1989。台灣杜鵑花屬植物之訂正。林業試驗所研究報告季刊 4(4):155-166。

金恆鑣。1999。生物多樣性保育概念的形成。P.1-11。生物多樣性研討會論文集。行政院農業委員會編印，台北。

林明勇、應紹舜。1993。烏來杜鵑於原生地復育之研究。中華林學季刊 26 (2):15-38。

林素夷。1991。唐杜鵑、大屯杜鵑與中原杜鵑的電泳與葉部型態分析。國立台灣大學碩士論文。73 pp.

范明仁、羅舜芳、王昭月、許庭榮、曹文隆、楊金興、鄭耀星。1999b。台灣落花生種原之親緣關係之研究 II.應用 RAPD 進行落花生種原親緣關係之研究。中華農業研究 48(2):67-85。

Asakura, N., C. Nakamura and I. Ohtsuka. 1997. RAPD markers linked to the nuclear gene from *Triticum timopheevii* that confers compatibility with *Aegilops squarrosa* cytoplasm on alloplasmic durum wheat. Genome 40: 201-210.

Blok, V. C., M. S. Phillips and B. E. Harrower. 1997. Comparison of British populations of potato *cyst* nematodes with populations from continental Europe and South America using RAPDs. Genome 40:286-293.

Brown, P. T. H., F. D. Lange, E. Kranz, and H. Loerz. 1993. Analysis of single protoplasts and regenerated plants by PCR and RAPD technology. Mol. Gen. Genet. 237:311-317.

Delourme, R., A. Bouchereau., N. Hubert and M. Renard. 1994. Identification of RAPD markers linked to a fertility restorer gene for the *Ogura* radish cytoplasmic male sterility of rapeseed (*Brassica napus* L.). Theor. Appl. Genet. 88:741-748.

Demeke, K., D. R. Lynch, L. M. Kawchuk, G. C. Kozub and J. D. Armstrong. 1996. Genetic diversity of potato determined by random amplified polymorphic DNA analysis. Plant Cell Rep. 15:662-667.

Iqbal, M. J., D. W. Paden, and A. L. Rayburn. 1995. Assessment of genetic relationships among *Rhododendron* species, varieties and hybrids by RAPD analysis. Scientia Horticulture 63:215-223.

Isabel, N., T., M. Michard, F. M. Tremblay and J. Bousquet. 1993. RAPDs as an aid to evaluate the genetic integrity of somatic embryogenesis derived populations of *Pricea mariana* (Mill.) B. S. P. . Theor. Appl. Genet. 86:81-87.

Levi, A., L. J. Rowland and J. S. Hartung. 1993. Production of reliable randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) markers from DNA of woody plants. HortScience 28:1188-1190.

Mikkelsen, T. R., J. Jensen and R. B. Jorgensen. 1996. Inheritance of oilseed rape (*Brassica napus*) RAPD markers in backcross progency with *Brassica campestris*. Theor. Appl. Genet. 92:492-497.

Millan, T., F. Osuna, S. Cobos, A. M. Torres and J. I. Cubero. 1996. Using RAPDs to study phylogenetic relationships in *Rosa*. Theor. Appl. Genet. 92:273-277.

Oard, J. H. and S. Dronavalli. 1992. Rapid isolation of rice and maize DNA for analysis by random-primer PCR. Plant Mol. Bio. Rep. 10:236-241.

Orozco-Castillo, C., K. J. Chalmers, R. Waugh and W. Powell. 1994. Detection of genetic diversity and selective gene introgression in coffee using RAPD markers. Theor. Appl. Genet. 87:934-940.

Parani, M., M. Lakshmi, S. Elango, N. Ram, C. S. Anuratha and A. Parida. 1997. Molecular phylogency of mangroves II. Intra- and inter-specific variation in *Avicennia* revealed by RAPD and RFLP markers. Genome 40:487-495.

Rogers, S. O., and A. J. Bendich. 1994. Extraction of total cellular DNA from plants, algae and fungi. D1:1-8 *In:* Plant Molecular Biology Manual. Kluwer Academic Publishers. New York.

Stiles, J. I., C. Lemme, S. Sondur, M. B. Morshidi, and R. Manshardt. 1993. Using randomly amplified polymorphic DNA for evaluating genetic relationships among papaya cultivars. Theor. Appl. Genet. 85:697-701.

Swoboda, I. and P. L. Bhalla. 1997. RAPD analysis of genetic variation in the Australian fan flower, *Scaevola*. Genome 40: 600-606.

Tivang, J. P. W. Skrocg and J. Nienhuis. 1996. Randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) variation among and within Artichoke (*Cynara scolymus* L.) cultivars and breeding population. J. Amer. Soc. Hortic. Sci. 12:783-788.

Welsh, J. and M. McClelland. 1991. Genomic fingerprinting using arbitrarily primer PCR and a matrix of pairwise combinations of primers. Nucleic Acid Res. 19: 5275-5279.

Wilkie, S. E., P. G. Isaac, and R. J. Slater. 1993. Random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers for genetic analysis in *Allium*. Theor. Appl. Genet. 86: 497-504.

Williams, J. G., A. R. Kubelik, K. J. Livak, J. A. Rafalski, and S.V. Tingey. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. Nucleic Acid Res. 18:6531-6535.

Xiao, J., J. Li, L. Yuan, S. R. McCouch, and S. D. Tanksley. 1996. Genetic diversity and its relationship to hybrid performance and heterosis in rice as revealed by PCR-based markers. Theor. Appl. Genet. 92:637-643.

Yang, X. and C. Quiros. 1993. Identification and classification of celery cultivars with RAPD markers. Theor. Appl. Genet. 86:205-212.

Yu, L. X. and H. T. Nguyen. 1994. Genetic variation detected with RAPD markers among upland and lowland rice cultivars (*Oryza sativa* L.). Theor. Appl. Genet. 87:668-672.

The Genetic Diversity Analysis of *Rhododendron* Native in Taiwan[1]

Ming-Jen Fan[2,4], Jau-Yueh Wang[2], Shuen-Fang Lo[2]
and Yen-Hsueh Tseng [3]

Summary

Fan, M. J., J. Y. Wang., S. F. Lo, and Y. H. Tseng. 2003. The genetic diversity analysis of *Rhododendron* native in Taiwan. J. Agric. Res. China 52:258-267.

A total of 23 accessions including 11 species of *Rhododendron* native in Taiwan which were collected from different areas, were evaluated by using randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) marker. Objectives were to evaluate genetic distance within those 11 species. Screening from sixty primers and eighteen unique DNA fragments were derived from 7 polymorphic primers. They can be used to distinguish the 7 species from the total 11 species, such as *R. oldhamii*, *R. rubropilosum*, *R. ovatum*, *R. hyperthrum*, *R. ellipticum*,*R. breviperulatum*, and *R. mariesii*. A dendrogram generated by UPGMA (Unweighted Pair-Group Mean Arithmetic) cluster analysis is closed relationship with the taxonomic classification of "Flora of Taiwan". Four sub-groups can be clustered by RAPD results. The results also show the varieties in the '*R. oldhami*' were clustered into the same subgroup. In brief, that the RAPD markers is an effectively and reliably method for analysis of the genetic distance of *Rhododendron* native in Taiwan.

Key words : *Rhododendron*, RAPD, Cluster analysis, Genetic diversity.

---

1. Contribution No.2168 from Agricultural Research Institute, Council of Agriculture. Accepted : August 28,2003.
2. Respectivaly, Research Fellow and Head, Assistant Horticulturist, Engaged Technician, Plant Germplasm Division, ARI, Wufwng, Taichung, Taiwan, ROC.
3. Assistant, Research Fellow, Botany Division, Taiwan Endemic Species Research Institute, Chichi, Nantou, Taiwan, ROC.
4. Correponding author, e-mail: mjfan@wufeng.tari.gov.tw, Fax: (04)23331705.